

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**LAÍS LOURDES PORTO**

**LILLIAN ROBERTA VIEIRA DA ROSA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE COENTRO (*Coriandrum sativum l.*) E ORÉGANO  
(*Origanum vulgare l.*)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PONTA GROSSA**

**2018**

**LAÍS LOURDES PORTO**

**LILLIAN ROBERTA VIEIRA DA ROSA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE COENTRO (*Coriandrum sativum l.*) E ORÉGANO  
(*Origanum vulgare l.*)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, do curso de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helene Giovanetti Canteri

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Aparecida Fagundes Queiroz Bortolozo

**PONTA GROSSA**

**2018**



## TERMO DE APROVAÇÃO

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COENTRO (*Coriandrum sativum* L.) E ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)

por

LAÍS LOURDES PORTO E LILLIAN ROBERTA VIEIRA DA ROSA

Este(a) Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado(a) em 29 de Junho de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O(a) candidato(a) foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

\_\_\_\_\_  
(Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helene Giovaneti Canteri)  
Prof.(a) Orientador(a)

\_\_\_\_\_  
(Prof. MsC Luis Alberto Chavez Ayala )  
Membro titular

\_\_\_\_\_  
(Mariely Cristine dos Santos)  
Membro titular

A Folha de Aprovação assinada encontra-se arquivada na Secretaria Acadêmica –

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiramente a Deus, a nós Laís e Lillian, a nossa família. As nossas orientadoras por primeiramente aceitar nosso projeto, e por serem tão pacientes.

Agradecemos a Beth, por ser uma excelente laboratorista e nos ajudar em diversas partes do nosso trabalho.

Agradecemos a Mariely por nos acompanhar nesse projeto e nos salvar nos momentos de desespero.

Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,  
e o homem que adquire conhecimento.

Provérbios 3, 13

Você é eternamente responsável por tudo aquilo que cativas.

Pequeno Príncipe

## RESUMO

PORTO, Laís Lourdes; ROSA, Lillian Roberta Vieira da; **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COENTRO (*Coriandrum sativum L.*) E ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*)**. 2018. 33 f. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2018.

Os óleos essenciais são materiais líquidos, extraídos de plantas aromáticas por diversos métodos e potencialmente utilizados como fontes de compostos bioativos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano de óleos essenciais de coentro e orégano, para possíveis utilizações como conservantes naturais. Os processos de extração de óleos essenciais testados foram hidrodestilação por arraste de vapor, destilação por aparelho Clevenger, destilação por aparelho Soxhlet, percolação, extração a frio e enfloração. Foram realizados testes para potencial antimicrobiano, bem como análises de pH, acidez e cor. O método mais efetivo para obtenção dos óleos essenciais de coentro e orégano foi a enfloração, com aumento da acidez, diminuição do pH e alteração da cor com relação ao óleo mineral base. Os resultados obtidos para potencial antibacteriano não foram satisfatórios para o presente trabalho, sendo assim impulsionam novos estudos na busca de meios de cultura lipossolúveis ou aumento da concentração dos componentes nos óleos essenciais, pois esse tipo de análise depende de vários fatores intrínsecos e extrínsecos.

**Palavras-chaves:** óleo essencial, antibacteriano, coentro, orégano, extração de óleo essencial

## ABSTRACT

PORTO, Laís Lourdes; ROSA, Lillian Roberta Vieira da; **EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS OF COENTRO (*Coriandrum sativum* L.) AND ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)**. 2018. 23 f. Completion of course work - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2018.

Essential oils are liquid materials, extracted from aromatic plants by various methods and potentially used as sources of bioactive compounds. The present study aimed to evaluate the antibacterial potential of coriander and oregano essential oils for possible uses as natural preservatives. The essential oil extraction processes tested were hydrodistillation by steam traction, distillation by Clevenger apparatus, distillation by Soxhlet apparatus, percolation, cold extraction and inflow. Tests were carried out for antimicrobial potential, as well as analyzes of pH, acidity and color. The most effective method to obtain the essential oils of coriander and oregano was inflow, with increase of acidity, decrease of pH and alteration of color comparing to the base mineral oil. The results obtained for antibacterial potential stimulate new studies in the search for liposoluble culture media or increase the concentration of the components in the essential oils, since this type of analysis depends on several intrinsic and extrinsic factors.

**Keywords:** essential oil, antibacterial, coriander, oregano, essential oils extraction

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de extração para os óleos essenciais de coentro e orégano.....	24
Tabela 2 - Resultados análise susceptibilidade antimicrobiana pelo método de antibiogramas.....	25
Tabela 3 - Resultados análise susceptibilidade antimicrobiana.....	25
Tabela 4 - Resultados análise susceptibilidade antimicrobiana pelo método descrito por Hammer et al. 1999.....	26
Tabela 5 - Resultados análise de pH dos óleos essenciais obtido pelo método de enfloração.....	27
Tabela 6 - Resultados análise de acidez dos óleos essenciais obtido pelo método de enfloração.....	28
Tabela 7 - Resultado análise de cor dos óleos essenciais obtidos pelo método de enfloração.....	28

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Esquema do sistema de hidrodestilação por arraste de vapor.....	15
Figura 2 - Esquema do aparelho Clevenger para extração.....	16
Figura 3 - Esquema de extração de óleos essenciais pelo aparelho Soxhlet.....	17
Figura 4 - Esquema de extração por percolação.....	18
Figura 5 - Esquema de extração a frio (maceração).....	18
Figura 6 - Esquema de extração por enfloração.....	19

## **LISTA DE ABREVIATURA**

microL	Microlitros
mL	Mililitros
L	Litros
g	Gramas
MHA	Ágar Mueller Hinton
BHI	Caldo Infusão Cerebro Coração
CIM	Concentração inibitória microbiológica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS	15
2.2 COENTRO ( <i>Coriandrum sativum</i> L.)	15
2.3 ORÉGANO ( <i>Origanum vulgare</i> L.)	16
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	16
2.4.1 EXTRAÇÃO	16
2.4.2 Hidrodestilação por Arraste de Vapor	17
2.4.3 Hidrodestilação com Aparelho Clevenger	17
2.4.4 Destilação com Aparelho Soxhlet	18
2.4.5 Percolação	19
2.4.6 Extração a Frio	20
2.4.7 Enfloração	21
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
3.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	22
3.1.1 Hidrodestilação por Arraste de Vapor	22
3.1.2 Hidrodestilação com Aparelho Clevenger	22
3.1.3 Destilação com Aparelho Soxhlet	22
3.1.4 Percolação	23
3.1.5 Extração a Frio	23
3.1.6 Enfloração	23
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	23
3.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)	23
3.2.2 Acidez Titulável	23
3.2.3 Análise de Cor	24
3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (ANTIBIOGRAMA)	24
3.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE MICROBIANA	25

3.5 MÉTODO DILUIÇÃO EM ÁGAR	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>26</b>
4.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA (pH, ACIDEZ TÍTULAVEL E ANÁLISE DE COR)	26
4.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)	26
4.2.2 Acidez Titulável	27
4.2.3 Análise de Cor	27
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	28
4.3.1 Teste 1: Sensibilidade dos Óleos Essenciais (Antibiograma)	28
4.3.2 Teste 2: Susceptibilidade Microbiana	29
4.3.3 Teste 3: Método de Diluição em Ágar	29
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As especiarias são conhecidas por fornecerem sabor e aroma aos pratos culinários. No entanto, além dessa função, possuem potencial inibidor frente à ação de micro-organismos e, como estão inseridos no grupo dos alimentos, esses tipos de conservantes são mais aceitos pela população, principalmente pelo fato da busca das indústrias por produtos cada vez mais saudáveis (TRAJANO et al., 2009). Essa propriedade conservante das especiarias está relacionada com a presença de compostos antibacterianos na sua composição, sendo os principais os óleos essenciais, os ácidos orgânicos, os ésteres, os fenóis e os álcoois que, em sua grande maioria, além de possuírem um alto poder antibacteriano, também apresentam características antioxidantes (STEURER, 2008).

Os óleos essenciais mais comumente utilizados na indústria de alimentos são os derivados de frutas, visando trazer aroma e sabor característico. Porém, especiarias como coentro, cravo, canela e orégano também são amplamente utilizados na indústria como condimentos. Segundo Santos et al. (2012), os principais responsáveis pelo poder antibacteriano dos condimentos, são os compostos fenólicos como carvacrol, linalol, timol, mentol, limoneno, eugenol. Boa parte dos óleos essenciais é composta por uma ou mais substâncias como as citadas, relacionadas à permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana e devido a essas características, inibem ou não o crescimento microbiológico (SANTURIO, 2011).

Dentre as especiarias, pode-se citar o coentro, erva originária do oriente, exala um forte odor enquanto seus frutos não amadurecem. Após o amadurecimento, seu cheiro se torna adocicado e característico. Essa especiaria, por sua vez, pode ser consumida em forma de pó, fresca ou desidratada e moída.

Orégano, planta semelhante à manjerona, pertencendo ao mesmo gênero, difere pelo tamanho e cor de suas flores, com sabor e cheiro não adocicados, comumente utilizado seco, em pratos como a tradicional pizza (PHILIPPI, 2006). Esses dois condimentos são ricos em linalol e carvacrol respectivamente, sendo considerados potenciais agentes antibacterianos.

Tendo em vista o potencial antibacteriano dessas especiarias, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano dos óleos essenciais de coentro e orégano, para a utilização desses óleos como alternativa para uso como conservantes naturais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são materiais líquidos, extraído de plantas aromáticas por diversos métodos. Devido a alta quantidade de compostos fenólicos, possuem inúmeros benefícios para a saúde e bem estar humano, dentre eles seu potencial antibacteriano (GONÇALVES e GUAZZELLI, 2014). Seu uso vem de milhares de anos, tendo um de seus primeiros registros há mais de 7000 a.C pelos chineses, mas há relatos de serem utilizados por egípcios, hindus e árabes (TRANCOSO, 2013)

Atualmente há cerca de 300 tipos óleos essenciais, amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, perfumaria, indústrias de tintas e alimentícia, com aplicação para aromatizar e saborizar alimentos prontos para consumo (GONÇALVES e GUAZZELLI, 2014).

De acordo com a estrutura química, os óleos essenciais são compostos lipídicos naturais segregados pelas glândulas presentes em diversas partes das plantas, como flores, folhas, raízes, frutos, grãos, madeiras ou de cascas. Podem ser obtidos por métodos de destilação, hidrodestilação e por solventes, sendo uma mistura complexa de substâncias precursoras de ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos, responsáveis pela seu teor antibacteriano, assim como potencial antioxidante (TRANCOSO, 2013; GONÇALVES e GUAZZELLI, 2014). Comumente as substâncias responsáveis pelo potencial antibacteriano dos óleos essenciais são as de origem fenólicas, como o linalol, eugenol, carvacol, alicina, camferol entre outros (SANTURIO, 2011).

### 2.2 COENTRO (*Coriandrum sativum* L).

Planta aromática amplamente utilizada como especiaria nas regiões norte e nordeste do Brasil, classificada como planta herbácea originária do Mediterrâneo. Sua utilização pode ser feita através do seu caule, raiz, folhas, frutos e sementes, secos ou *in natura*, também com utilização medicinal. Nesta, dá-se enfoque para as suas propriedades nutricionais e farmacêuticas, suas sementes e seu óleo essencial, com atividades antioxidantes, antimicrobianas, hipoglicemiante, anti-hiperlipidêmica, analgésica, anti-inflamatória, anti-convulsivante entre outras; portanto, considerada uma

erva aromática largamente estudada para comprovação de seus compostos bioativos (SAKURAI et al, 2016).

Sua atividade antibacteriana é atribuída à presença dos compostos fenólicos, carotenoides, taninos, flavonoides, cumarinas, saponinas e terpenos (SAKURAI et al., 2016). O principal componente responsável por tal potencial é o linalol, classificado como um monoterpene alcoólico terciário acíclico de odor distinto com diferentes propriedades químicas e efeitos biológicos, justificando sua importância para a indústria de cosméticos e fragrâncias, assim como a farmacêutica, saúde e alimentícia, através da medicina popular (CAMARGO, 2015).

### 2.3 ORÉGANO (*Origanum vulgare l.*)

Especiaria originada do Mediterrâneo, pertencente a família Lamiaceae, com sabor e aromas característicos, com principal aplicação feita na indústria alimentícia através de aromatizantes para produtos denominados tipo pizza. O composto utilizado para este fim é o óleo essencial de orégano, alvo de avaliações quanto às suas propriedades biológicas (SANTOS, 2012), devido aos seus potenciais antioxidantes, antimicrobianos.

Os principais componentes responsáveis pelo potencial antibacteriano desta planta são o timol e o carvacrol, fenóis monoterpênicos biosintetizados em plantas a partir do  $\gamma$ -terpineno e  $\rho$ -cimeno. O timol apresenta-se em forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos, com odor aromático semelhante ao tomilho, com gosto pungente com leve efeito cáustico, considerado pouco solúvel em água. Já o carvacrol, apresenta-se na forma líquida, de coloração amarela clara, gosto pungente e odor aromático semelhante ao do orégano, também sendo pouco solúvel em água (NEVES, 2009).

## 2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

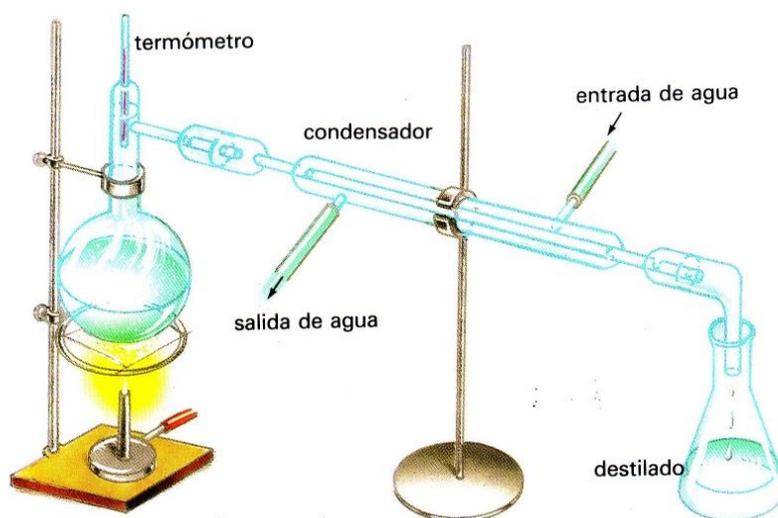
### 2.4.1 EXTRAÇÃO

Os métodos de extração para obter óleos essenciais variam de acordo com a parte da planta em que as células odoríferas se encontram, podendo estar nas flores, folhas, cascas, caules, raízes e rizomas, bem como os fins de utilização dos óleos essenciais. Os mais comuns métodos de extração são: hidrodestilação por arraste de

vapor, com aparelho Clevenger, aparelho Soxhlet, percolação, extração a frio (maceração) e enfloração (MONTEIRO, 2008), aos quais serão descritos logo abaixo.

#### 2.4.2 Hidrodestilação Por Arraste de Vapor

Consiste na utilização de altas temperaturas para que seja formado vapor, que passe pela amostra rompendo as células odoríferas presentes na planta aromática. Para que ocorra o rompimento, a corrente de vapor alimenta a coluna com a matéria-prima e extraem os compostos voláteis presentes. Há outro tipo de acomodação da matéria-prima para que este processo ocorra, na qual a mesma fica submersa em água. A destilação por arraste de vapor só pode ser considerada efetiva quando os dois fenômenos físicos, o de vaporização e condensação são utilizados em conjunto, assim liberando as substâncias voláteis desejadas (LEAL, 2008).



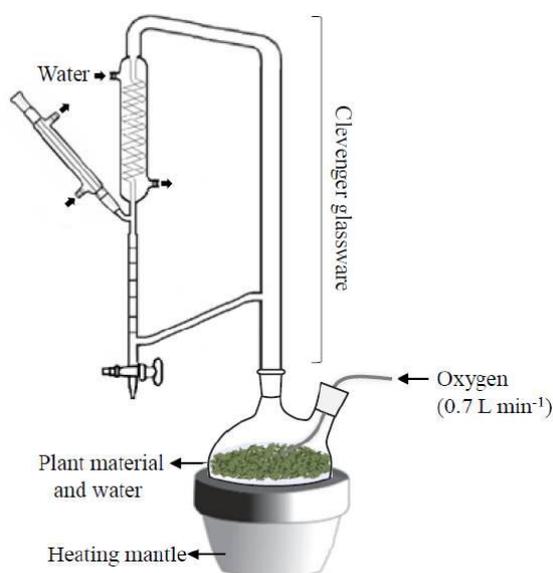
**Figura 1:** Esquema do sistema de hidrodestilação por arraste de vapor  
**Fonte:** COSTA, 2010

#### 2.4.3 Hidrodestilação com Aparelho Clevenger

De início, a matéria-prima é selecionada e higienizada com água corrente, e seca sobre uma camada de papel absorvente. A técnica consiste na utilização de água quente, que rompe os vacúolos que contém o óleo e faz o arraste deste até o condensador, onde ocorre a troca de calor fazendo com que tanto o óleo quanto a água retornem para o estado líquido. Na última etapa do processo, o óleo forma uma camada sobre a água devido a sua menor densidade e a água retorna para o balão através de um sistema de vasos comunicantes (SOARES, 2016).

A extração deve ocorrer durante o período de 3,5 horas, tempo o suficiente para a extração dos óleos essenciais, pois períodos mais longos podem ocasionar degradação dos constituintes. Para que não ocorra a fotoxidação, é necessário envolver a parte do aparelho Clevenger em que o óleo fica retido até o final do processo de extração com papel alumínio (SOARES, 2016).

Para a purificação do óleo é utilizado sulfato de sódio anidro, que realiza a secagem da água residual, sendo em seguida filtrado e transferido para um frasco âmbar, sendo necessária a refrigeração para o seu armazenamento (SOARES; ETHUR; CONTRI, 2016)



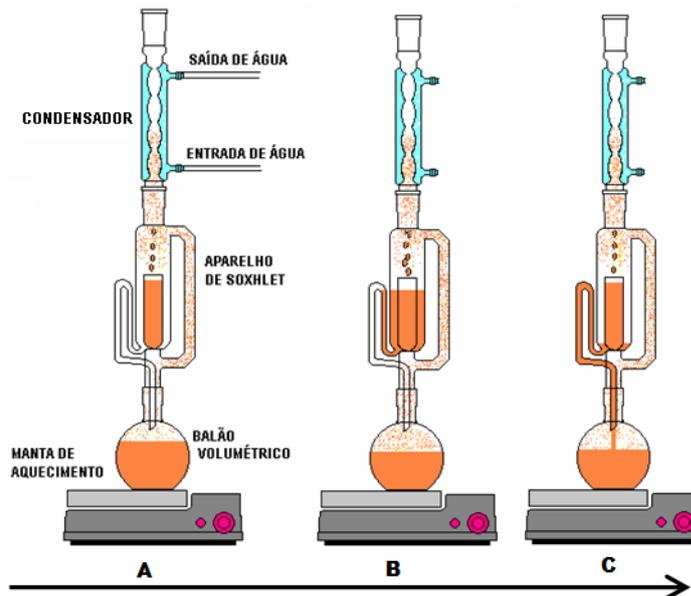
**Figura 2:** Esquema do aparelho Clevenger para extração  
**Fonte:** Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais, 2011

#### 2.4.4 Destilação com Aparelho Soxhlet

Processo contínuo para a extração de lipídeos a partir de alimentos, por repetidas lavagens com solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição, como o hexano, éter ou éter etílico sob refluxo. Essa técnica é bastante útil no caso de compostos puros parcialmente solúveis em um solvente. Nesse método, a amostra é seca e moída em pequenas partículas e colocada em um cartucho poroso colocado na câmara de extração localizada acima do balão que contém o solvente e abaixo do condensador. O balão é aquecido e evapora o solvente que

se move na fase gasosa em direção ao condensador, no qual é convertido em um líquido que goteja no cartucho com a amostra (BRAZACA, 2016).

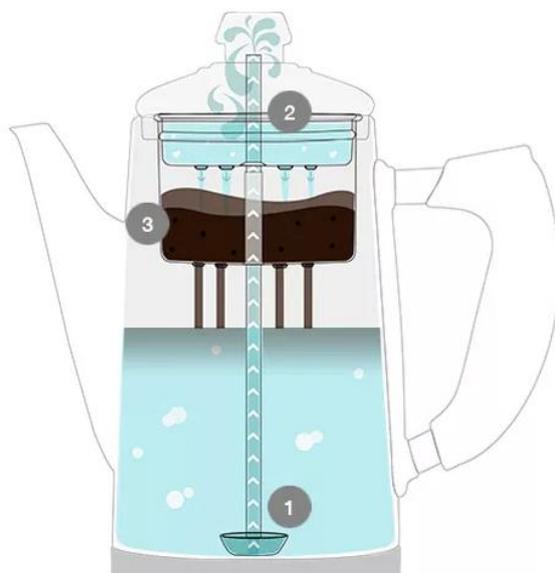
A desvantagem dessa técnica como método de extração é a utilização de grandes volumes de solventes e um longo período de extração podendo chegar a 72 horas, sendo os componentes extraídos possivelmente afetados pela decomposição térmica ou pela reação com os solventes (RODRIGUES, 2002)



**Figura 3:** Esquema de extração de óleos essenciais pelo aparelho Soxhlet  
**Fonte:** GASTALDI, 2010

#### 2.4.5 Percolação

Processo dinâmico onde se faz o arraste do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento da planta através do gotejamento lento do material. Permite obter soluções extrativas mais concentradas, com economia do líquido extrator e tempo relativamente curto. Para substâncias farmacologicamente ativas ou com pouca solubilidade, a percolação é método extrativo mais indicado, devido ao seu processo rápido; já para plantas com elevado teor de substâncias solúveis não é indicado, devido a aumentar a viscosidade durante o processo (SCHIMIDT, 2005).



**Figura 4:** Esquema de extração por percolação  
**Figura 4:** Cadence, 2016

#### 2.4.6 Extração a Frio

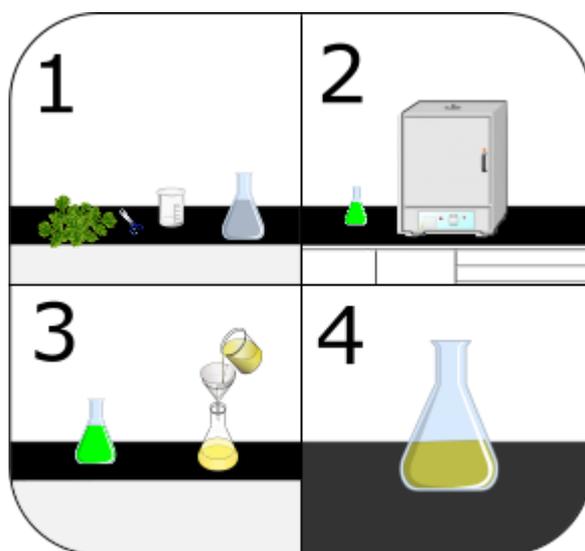
É uma técnica na qual a extração da planta é realizada em um recipiente fechado em temperatura ambiente durante um longo período sob agitação e sem remoção do solvente extrator, sendo também utilizados solventes orgânicos em função da polaridade. De acordo com o processo, não há esgotamento da matéria-prima, seja devido a saturação do liquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Apresenta menor risco de reações químicas na formação de compostos secundários decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas (RODRIGUES, 2002).



**Figura 5:** Esquema de extração a frio (maceração)  
**Fonte:** Autoria própria, 2017

### 2.4.7 Enfloração

Método muito utilizado na antiguidade, mas atualmente empregado por algumas indústrias de perfumes no caso de algumas plantas de baixo teor de óleo e alto valor comercial, como para extrair óleo essencial de pétalas de flores. As pétalas são depositadas em telas de gordura, a temperatura ambiente, durante um certo tempo. Em seguida, essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto obtido possui alto valor comercial (SIMÕES, 1999)



**Figura 6:** Esquema de extração por enfloração  
**Fonte:** Autoria própria, 2018

### 3 METODOLOGIA

As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia e Química Orgânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *Campus* Ponta Grossa. As amostras de folhas desidratadas de coentro e orégano foram obtidas em mercados situados na cidade de Ponta Grossa. As cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e os antibióticos Vancomicina e Teicoplanina utilizados foram cedidos pelo laboratório de Microbiologia da UTFPR.

#### 3.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os métodos utilizados para obtenção dos óleos essenciais foram hidrodestilação por arraste de vapor, hidrodestilação com aparelho Clavenger, destilação com aparelho Soxhlet, percolação, extração a frio e enfloração.

##### 3.1.1 Hidrodestilação por Arraste de Vapor

Consistiu na pesagem e trituração das amostras *in natura*, depositando 100g das amostras em balões de fundo redondo com 500 mL de água destilada. A hidrodestilação durou 4 horas à temperatura de ebulição. O destilado obtido através do processo foi seco com NaSO<sub>4</sub>, filtrado e levado à estufa de secagem sem circulação a 60°C até atingir massa constante.

##### 3.1.2 Hidrodestilação com Aparelho Clevenger

Pesaram-se 100g das amostras que posteriormente foram colocadas em um balão de fundo redondo contendo água destilada para agir como solvente. O aparelho foi conectado às correntes de água e o balão aquecido até a ebulição da água presente nele, durante 3 horas. Posteriormente, o destilado foi retirado e o diclorometano utilizado para separação das fases água e óleo. O líquido obtido foi seco em equipamento rota-evaporador Fisatom até total separação do solvente diclorometano.

##### 2.1.3 Destilação com Aparelho Soxhlet

As amostras utilizadas foram liofilizadas, em seguida, 10g de cada amostra foi pesada e colocada em saquinhos de papel filtro para introdução no aparelho Soxhlet, conectado às correntes de água e aquecido até o ponto de ebulição da água adicionada

no balão, durante 3 horas. O destilado obtido foi colocado em um funil de decantação para separação das fases e posterior armazenamento.

#### 3.1.4 Percolação

As amostras utilizadas nesta extração passaram pelo processo de liofilização, para posterior utilização. A extração consistiu em colocar em uma cafeteira italiana, 5g da amostra em local adequado, com água destilada no compartimento inferior, aquecendo o equipamento até o ponto de ebulição durante 2 horas, sendo o extrato obtido armazenado para posterior utilização.

#### 3.1.5 Extração a Frio

Para realização do processo de extração a frio, foram utilizadas 3g de cada amostra *in natura* que foram maceradas em graal de porcelana até total trituração. Os triturados obtidos foram embebidos em álcool 70% para diluição dos extratos, centrifugados por 30 min a 500 rpm em centrífuga CELM COMBATE para separação do óleo do extrato e armazenados em vidro âmbar.

#### 3.1.6 Enfloração

Aproximadamente 3 g de folhas desidratadas foram colocadas em 30 mL óleo mineral, submetidos a temperatura de  $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$  durante 72 horas. Após decorrido o tempo de extração, o extrato foi armazenado em frascos de vidros com tampa de alumínio envoltos em papel alumínio e conservados a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  na geladeira.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 3.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

As análises de pH foram realizadas em triplicata no equipamento Even PHS3E calibrado com as soluções tampão de pH 4 e pH 7.

#### 3.2.2 Acidez Titulável

Para análise de acidez titulável, foram utilizados 5 mL de cada amostra de óleo essencial junto com 5 mL de álcool 92%. Posteriormente, adicionou-se fenolftaleína 1% para agir como indicador ácido-base. Em uma bureta graduada, com solução de

hidróxido de sódio a 0,1 N, titulou-se através de gotejamentos as soluções até atingir o ponto de viragem.

### 3.2.3 Análise de Cor

A análise de cor dos óleos essenciais foi realizada em triplicata com o Colorímetro UltraScan PRO da HunterLab, pelo sistema CIELAB. No sistema CIELAB, a coordenada L\* representa o nível de luminosidade da cor a ser medida, onde valores mais próximos de zero expressam cor escura – visto que o zero representa o preto – e os valores mais próximos de cem expressam o claro, já que o número cem representa a cor branca. A coordenada a\* representa a variação entre o vermelho, representada por um número positivo e o verde, representado por um número negativo. Por fim, a coordenada b\* representa o nível de variação entre o azul, indicado por um número negativo, e o amarelo, indicado por um número positivo (HUNTERLAB, 2012; BORGES, et al., 2013). Para fins de comparação, analisou-se também a cor de uma amostra óleo mineral, em triplicata para ser considerada como amostra padrão. Os valores de a\* e b\* foram utilizados para calcular o ângulo de matiz (h°) (1) e o croma (C\*) (2), através das seguintes equações:

$$H^{\circ} = \arctan\left(\frac{a^*}{b^*}\right) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{[(a^*)^2 + (b^*)^2]} \quad (2)$$

### 3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (ANTIBIOGRAMA)

Para a realização dos testes de antibiograma utilizaram-se cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, por serem micro-organismos adequados ao meio de cultura a ser utilizado, previamente cultivou-se em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Após o cultivo de 24 horas em caldo BHI, inoculou-se em triplicata 100µl do caldo em placas de Petri contendo o meio Ágar Mueller Hinton (MHA), espalhando o inóculo sobre o meio de cultura com o auxílio de alças de Drigalski.. Em cada placa foi colocado um disco de papel filtro embebido pelos óleos essenciais de coentro e orégano nas seguintes concentrações 10 µL, 20 µL e 30 µL; como controle positivo utilizou-se água destilada autoclavada e controle negativo os

antibióticos Vancomicina para *Staphylococcus aureus* e Canamicina para *Pseudomonas aeruginosa*. As placas foram incubadas a 35 °C em estufa bacteriológica por 12 horas; após a incubação, realizou-se a medição do diâmetro dos halos com o auxílio de um paquímetro para verificação da concentração inibitória mínima (CIM), que de acordo com o protocolo da ANVISA (2000) mensura a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento microbiológico.

### 3.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE MICROBIANA

A realização dos testes foi através de metodologia própria, sendo previamente cultivados os micro-organismos em caldo BHI por 24 h a 35 °C em estufa bacteriológica. Posteriormente, foram semeados 10 µL dos micro-organismos em placas de MHA com auxílio da alça de Drigalski em superfície, contendo os óleos essenciais nas seguintes concentrações 10 µL, 100 µL e 1000 µL. Novamente, utilizou-se como controle positivo água destilada autoclavada e controle negativo Vancomicina para *Staphylococcus aureus* e Canamicina para *Pseudomonas aeruginosa*. As placas foram incubadas a 35 °C por 12 h. Decorrido o tempo de incubação, analisou-se visualmente as placas para verificação do crescimento microbiológico.

### 3.5 MÉTODO DILUIÇÃO EM ÁGAR

Realizaram-se os testes de acordo com a metodologia descrita por Hammer (1999). Inicialmente, cultivaram-se os micro-organismos em caldo MHA por 6 horas e posteriormente inocularam-nos em placas com MHA adicionados de Tween 80 0,5% com concentrações de óleos essenciais de 10 µL, 100 µL e 1000 µL. O controle positivo foi a água autoclavada e o controle negativo foi os antibióticos Vancomicina para *Staphylococcus aureus* e Canamicina para *Pseudomonas aeruginosa*. A semeadura foi realizada em superfície com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35 °C por 12 horas e a verificação dos resultados ocorreu por comparação entre as contagens de unidades formadoras de colônias dos controles positivos e negativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Diante das extrações realizadas, pode-se observar que determinados tipos de extrações foram ineficientes devido a especificações das matérias primas. Os óleos essenciais utilizados para o desenvolvimento deste projeto são de difícil extração, por estarem em pequenas quantidades nas plantas.

Com a extração por meio de hidrodestilação por arraste de vapor e aparelho soxhlet não foi obtido extrato ao final do processo tanto para as amostras de coentro como a de orégano.

Com relação as extrações realizadas por aparelho Clevenger, percolação e extração a frio não ocorreu a separação das fases entre os compostos utilizados.

Para a extração realizada com o método de enfloração obteve-se o óleo essencial pela solubilidade em óleo mineral, onde foi verificada as características de coloração e aroma pertencentes as ervas extraídas, aos quais foram o aroma adocicado para o coentro e coloração esverdeada e para o orégano o aroma característico e coloração que tende ao amarelo

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS POR ENFLORAÇÃO

#### 4.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH )

Os resultados obtidos com as análises de pH estão descritos na tabela 5 e demonstram que o processo de extração acidificou o solvente, ocorrendo a queda no pH dos óleos obtidos.

**Tabela 1: pH dos óleos essenciais obtido pelo método de enfloração**

Óleos essenciais	pH
Óleo mineral	6,05± 0,007
<i>Coriandrum sativum l.</i>	3,51± 0,008
<i>Origanum vulgare l.</i>	5,78± 0,005

**Fonte: Autoria própria (2018)**

#### 4.2.2 Acidez Titulável

De acordo com a legislação brasileira os óleos e gorduras extraídos de plantas devem possuir valores de acidez titulável entre 0,3g/mL a 0,8g/mL, estando assim os óleos extraídos por enfloração dentro dos padrões exigidos pela ANVISA (Brasil, 2000).

**Tabela 2: Acidez dos óleos essenciais obtido pelo método de enfloração**

Óleos essenciais	Acidez
Óleo mineral	0,1g/mL± 0,0
<i>Coriandrum sativum l.</i>	0,3g/mL± 0,0
<i>Origanum vulgare l.</i>	0,7g/mL± 0,0

Fonte: Autoria própria

Dessa maneira, podem ter a finalidade de conservante natural de alimentos, pois seus valores estão dentro dos padrões.

Com relação às análises de pH e acidez titulável não encontrou-se na literatura resultados, dificultando discussões a respeito dos dados obtidos.

#### 4.2.3 Análise de Cor

Os resultados para a análise de cor para os parâmetros L\*, a\* e b\* estão descritos na Tabela 7.

**Tabela 7: Resultado análise de cor dos óleos essenciais obtidos pelo método de enfloração**

Óleos essenciais	Parâmetros		
	L*	a*	b*
Óleo mineral	0,27±0,051	0,18±0,147	-0,82±0,033
<i>Coriandrum sativum l.</i>	0,10±0,006	0,76±0,006	0,18±0,100
<i>Origanum vulgare l.</i>	0,11±0,006	0,84±0,047	0,20±0,000

Fonte: Autoria própria (2018)

O parâmetro L\* caracteriza a luminosidade na escala de 0 (preto) a 100 (branco), levando em consideração que os resultados obtidos ficaram próximo a 0 pode-se concluir que os óleos essenciais obtidos por enfloração possuem colorações mais escuras, divergindo dos resultados obtidos por Pontes (2013) onde os resultados obtidos na análise de cor para os óleos essenciais de cravo, canela e orégano ficaram próximos a 60, considerando os óleos de coloração clara.

Para o parâmetro  $a^*$  considera-se que valores negativos tendem a coloração verde, e valores positivos a coloração vermelha, sendo assim os resultados obtidos são indicam que os óleos essenciais extraídos tendem a coloração verde. Com relação aos resultados para o parâmetro  $b^*$  valores negativos pertencem a coloração azul, e positivos a coloração amarela, considerando que os resultados obtidos variaram entre 0,18 a 0,20 pode-se afirmar que apresentam coloração amarela. Resultando então em óleos de coloração verde-amarelada.

De acordo com Prins; Lemos; Freitas (2009) e Monteiro (2008), as alterações ocorridas com as extrações foram devido as variáveis tempo e temperatura. Conforme a literatura, os processos de extração variam de acordo com cada amostra, necessitando de variáveis diferentes para cada processo, resultando em extratos pouco ricos em óleos essenciais e explicando os motivos dos problemas encontrados em separar as fases entre o solvente e soluto. Sendo assim, o método de extração através da enfloração se tornou o mais efetivo, pois as temperaturas eram brandas e utilizou-se mais tempo para a extração, sendo o método mais indicado para plantas semelhantes ao coentro e orégano, com baixo teor de óleo essencial. Adicionalmente, o processo é menos degradativo para os compostos, pois os óleos essenciais, assim como outros compostos bioativos vegetais, são sensíveis a altas temperaturas e processos intensos.

Com relação a pigmentação dos óleos podemos verificar que ocorre arraste da clorofila em métodos de extração, sendo assim a coloração tendenciosa ao verde ocorre devido a esta propriedade da clorofila em acompanhar os compostos extraídos.

### 4.3 Avaliação do Potencial Antimicrobiano

O teste de atividade antimicrobiana apresentou resultados insatisfatórios durante a verificação da resistência ou suscetibilidade dos micro-organismos frente aos óleos essenciais. Foram utilizadas bactérias Gram negativas e Gram positivas, bem como dois tipos de óleos essenciais concentrados e diluídos, realizando três testes por micro-organismo.

#### 4.3.1 Teste 1: Sensibilidade dos Óleos Essenciais (Antibiograma)

A Tabela 2 corresponde aos resultados dos testes realizados em antibiogramas, onde podemos visualizar claramente a não inibição microbiana medida através dos diâmetros dos halos em mm.

**Tabela 2: Resultados análise susceptibilidade antimicrobiana pelo método de antibiogramas**

Tratamentos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Coriandrum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Coriandrum</i>
	<i>l.</i>	<i>sativum l.</i>	<i>l.</i>	<i>sativum l.</i>
Positivo	3,45 mm	3,45 mm	3,0 mm	3,0 mm
Negativo	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm
10MI	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm
20µL	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm
30µL	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm

Fonte: Autoria própria, 2018

#### 4.3.2 Teste 2: Susceptibilidade Microbiana

De acordo com a Tabela 3 podemos visualizar que os resultados se parecem com a primeira análise, onde os óleos essenciais não foram efetivos contra as cepas utilizadas para o teste. Neste teste ocorre a divisão dos resultados entre sensível, nulo e resistente (HAMMER, CARAON e RILEY, 1999)

**Tabela 3: Resultados análise susceptibilidade antimicrobiana**

Tratamentos	Micro-organismos utilizados			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Coriandrum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Coriandrum</i>
	<i>l.</i>	<i>sativum l.</i>	<i>l.</i>	<i>sativum l.</i>
Positivo	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
Negativo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
10µL	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
100µL	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
1000µL	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Fonte: Autoria própria, 2018

#### 4.3.3 Teste 3: Método Diluição em Ágar

Segundo Hammer et al. (1999), os resultados do teste podem ser divididos entre sensível, nulo e resistente, como observado na Tabela 4, os óleos essenciais frente as cepas analisadas foram inefetivos já que as bactérias resistiram aos compostos.

**Tabela 4: Resultados análise susceptibilidade antimicrobiana pelo método descrito por Hammer et al. (1999)**

Tratamentos	Micro-organismos utilizados			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Coriandrum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Coriandrum</i>
	<i>l.</i>	<i>sativum l.</i>	<i>l.</i>	<i>sativum l.</i>
Positivo	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
Negativo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
10µL	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
100µL	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
1000µL	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

**Fonte: Autoria própria (2018)**

Diante do exposto nos resultados, pode-se verificar que mesmo ocorrendo a realização de mais de um tipo de análise de potencial antibacteriano os óleos utilizados não foram efetivos na inibição das cepas estudadas. Isso pode ocorrer devido a alguns fatores descritos por diversos autores. Conforme pesquisas realizadas por Santos et al. (2016), o óleo essencial de orégano possui potencial antibacteriano de baixa efetividade perante bactérias Gram negativas, pois a parede celular das mesmas é de maior espessura tornando difícil a entrada dos compostos para dentro da célula. Isso impede que o potencial antibacteriano tenha sucesso nos testes com este tipo de micro-organismo, comprovando assim os resultados encontrados com relação a *Pseudomonas aeruginosa*, micro-organismo Gram negativo, devido a sua coloração rosácea quando submetido à coloração de gram.

Com relação às cepas de *Staphylococcus aureus*, os resultados não diferem, visto que os óleos não realizaram a inibição do crescimento. Porém, ao contrário do que se verificou com relação à *Pseudomonas aeruginosa*, o micro-organismo testado é classificado como Gram positivo, com parede celular de menor espessura. Contudo, os resultados foram semelhantes devido a baixa solubilidade do óleo essencial diante do meio de cultura utilizado, pois os testes de potencial antibacteriano são padronizados para antibióticos hidrossolúveis, causando dificuldade para os óleos se solubilizarem e entrarem em contato com as células bacterianas. Segundo Hammer, Caraon e Riley. (1999), os testes para potencial antibacteriano necessitam de padronização com relação aos óleos essenciais, pois os resultados obtidos por esse autor em seus estudos, por mais satisfatórios que tenham sido, causaram divergências com pesquisas anteriores devido à falta de padronização. Isso também ocorreu com o presente estudo, já que não foram encontrados resultados que comprovassem a falta de efetividade de óleos essenciais de coentro e orégano, pois todos divergiam com relação ao potencial desde pouco efetivo (Ernandes et al. 2007) a altamente efetivo (Santos, 2013).

Pode-se verificar que há diversos fatores relacionados com a falta de efetividade dos óleos essenciais neste estudo. Contudo, foram encontrados resultados positivos com relação aos mesmos óleos como os resultados obtidos por Ernandes et al (2007), com modificações na forma de extração, tornando as comparações por vezes inconsistentes,

pois a forma de extração afeta a concentração e o tipo dos compostos presentes nos óleos.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu avaliar diversos parâmetros com relação as características físico-químicas dos óleos essenciais, desde sua extração até a utilização como potencial conservante. Porém, pode-se afirmar que óleos essenciais são de extrema sensibilidade com relação a temperatura, pois ocorreram degradações em virtude das formas de extração realizadas.

Assim, para uma melhor avaliação, é necessária a padronização dos métodos de aplicação dos compostos lipídicos como agentes antibacterianos, pois se os métodos permanecerem os mesmos, os resultados obtidos continuarão a se divergir. As variantes para este processo ser efetivo vem desde o plantio da planta a ser submetida ao processo de extração como também as formas de armazenagem dos mesmos. Também pode ser ressaltada a falta de solubilidade dos meios de cultura com relação a compostos lipídicos, o que dificultou a interação do óleo perante micro-organismos testados, ocasionando em falsos negativos, onde haverá crescimento microbiológico, porém sem a confirmação da efetividade do óleo essencial.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Portaria nº593, de 25 de agosto de 2000, **REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS E GORDURAS VEGETAIS**.

BORGES, C.D. *et. al.* Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, 2013

BRAZACA, Solange, Determinação de lipídeos, Departamento agroindústria, alimentos e nutrição – ESALQ/USP, 2016.

CAMARGO, S. B.; DE VASCONCELOS, D. F. S. A.. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2015.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H.. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 25, n. 2, 2007. APA

GONÇALVES, A.; GUAZZELLI, M. J. Agrofloresta e óleos essenciais. Centro Ecológico. 2014.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HUNTERLAB. Measuring Color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L\*a\*b\*: AN 1005.00, 2012. Disponível em: < <https://www.hunterlab.com/duplicate-of-an-1005-hunterlab-vs-cie-lab.pdf>> Acesso em 25 de novembro de 2017.

LEAL, P. F. et al. Estudo comparativo entre os custos de manufaturas e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor. 2008

MONTEIRO, O. dos S. Caracterização do óleo essencial da Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas Euglossina. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, 2008.

NEVES, D. O. Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratibilidade da aorta isolada de rato. 2009. 94 f. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas)-Instituto Superior de Ciências Biomédicas-Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza.

PHILIPPI, S. T; Nutrição e Técnica Dietética – 2. Ed. Ver. E atual. – Barueri, SP: Manole, 2006

PONTES, Sylvania Farias Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2013. Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos. Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Eber Antonio Alves Medeiros e João de Deus Souza Carneiro.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 92-95, 2006.

RODRIGUES, Maria Regina Alves. Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano. 2002.

SAKURAI, Fernanda Naomi et al. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.

SANTOS, G. et al. Estudo comparativo do coentro (*Coriandrum sativum* L.) seco obtido em diferentes métodos de secagem. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 3, p. 236-244, 2012.

SANTOS, Juliana Cantalino dos. Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliana*). 2013.

SANTURIO, Deise Flores et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos, **Ciência Rural**, v.41, n. 6, p. 1051-1056, 2011

SCHMIDT, Dionezine de Fátima Navarro et al. Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* para obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico. 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SPTIZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 467- 495.

SOARES, A. P. V.; ETHUR, E. M.; CONTRI, R. V. Metodologia para Extração de Óleos Voláteis a partir de Plantas de Interesse Farmacêutico. Anais da I Amostras de trabalhos dos cursos de Farmácia, Lajeado, 2016.

STEURER, Fabiane. Especiarias: aplicações e propriedades. 2008. 30f. Trabalho Acadêmico (Bacharelado em Química de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas,

TRAJANO, Vinicius Nogueira et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TRANCOSO, M.D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. Revista Práxis: Rio de Janeiro, n. 9, p. 89-96, jun. 2013.